

Aus dem Institut für Lufthygiene und Silikoseforschung
an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor: Dr. med. H. -W. Schlipkötter

Die therapeutische Beeinflussung
der quarzinduzierten Alveolitis durch PVNO

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hans Peter Hermann Wibbing

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533917_0072

Aus dem Institut für Lufthygiene und Silikoseforschung
an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor: Dr. med. H. -W. Schlipkötter

Die therapeutische Beeinflussung
der quarzinduzierten Alveolitis durch PVNO

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hans Peter Hermann Wibbing

1978

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent

gez.: Prof.-Doz. Dr. med. habil. Jochen Bruch

Korreferenz

gez.: Prof. Dr. Böttger

Druck und Einband: Rudolf Stehle GmbH & Co KG - Düsseldorf

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet





INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

Einleitung	3
Material und Methoden	4
Methodik der morphometrischen Auswertung	5
Ergebnisse	8
Diskussion	13
Zusammenfassung	17
Literatur	18

Einleitung

Die initiale Phase der silikotischen Entwicklung auf der Ebene der Alveolen wird durch die zytotoxischen Effekte der Quarzstäube auf die Alveolarmakrophagen bestimmt (1-5), als deren Folge sich die bronchiale Elimination der Stäube verschlechtert. Gleichzeitig penetrieren Partikeln vermehrt in das Lungeninterstitium und in die lymphatischen Bereiche der Lunge (6, 7). Der Pathomechanismus des Übertritts von Staub in die Alveolarsepten ist nicht völlig geklärt, doch scheinen neben der Zytotoxizität auch begleitende Reaktionen des Alveolarparenchyms, die vor allem in einer exzessiven Vermehrung von Surfactantlipiden besteht (8, 9), eine den Lymphotropismus begünstigende Rolle zu spielen. Die Bedeutung der gesteigerten Retention liegt vor allem in einer Erhöhung der Quarzdosis im septal-lymphatischen Kompartiment des Alveolarparenchyms, wo das für das klinische Krankheitsbild der Silikose entscheidende Geschehen - die fibrotische Entwicklung - stattfindet. Weiterhin wird diskutiert, inwieweit die Vermehrung der Surfactantlipide in der Alveole den Gasaustausch beeinträchtigt; besonders bei der akut verlaufenden Silikose scheint hierüber ein das klinische Krankheitsbild prägendes Symptom - die Atemnot - mitverursacht zu sein (10).

Die polymere Substanz PVNO vermag die fibrotische Entwicklung der experimentellen Silikose sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch günstig zu beeinflussen (11, 12). Elektronenoptische und morphometrische Experimente wiesen auch einen günstigen prophylaktischen Effekt von PVNO auf die quarzbedingten Veränderungen der Alveolen nach (13). Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, die therapeutische Wirksamkeit von PVNO auf die durch Quarzstaub verursachte Alveolitis zu prüfen.

Material und Methoden

Für die Tierversuche wurden weiße Ratten vom Typ Ivanovas (Kießlegg, Allgäu) mit einem Gewicht von ca. 200 g benützt. Die Tiere erhielten Standardfutter und Wasser ad libitum. 15 Ratten wurden im Polley'schen Staubkanal einer Quarzstaubkonzentration von 20 mg/m^3 ausgesetzt; es handelte sich um Dörentruper Quarz Nr. 12 (Korngröße $< 5 \mu$). Die Tiere inhalierten täglich 8 Stunden lang an 5 Tagen in der Woche; die Versuchsdauer betrug drei Monate. Nach Beendigung der Inhalation wurden 8 Tiere mit PVNO subcutan 200 mg/kg KG behandelt. Die restlichen Tiere aus den Inhalationskammern verblieben ohne Behandlung. Zwei Monate nach der Beendigung der Inhalation wurden alle Tiere, einschließlich 10 Kontrolltiere, für die morphometrische Auswertung der Lungen präpariert. In tiefer Nembutalnarkose wurde die Trachea freipräpariert, eine Kanüle eingebunden und nach Eröffnung des Thorax durch Inzision des Zwerchfells die Lunge durch Instillation mit Glutaraldehyd, 2%, gepuffert in Natriumcacodylat, 540 mosmol fixiert. Der Instillationsdruck betrug $12 \text{ cm/H}_2\text{O}$. Der Fixierungslösung war eine kleine Menge von Evansblau beigefügt, um den Fixierungserfolg anhand der Blaufärbung der Lunge zu kontrollieren. Der Druck reichte aus, die Lungen zu füllen ohne sie zu überblähen, was an der glatten Anpassung der gefüllten Lunge an den Thoraxraum zu erkennen war. Nach Füllung der Lunge wurde die Trachea abgebunden und das Organpaket für eine weitere halbe Stunde in der Thoraxhöhle belassen. Die Weiterfixierung erfolgte nach Herausnahme des Herz-Lungen-Paketes und Abpräparierung der linken Lunge. Hier wurde von einem systematischen Bereich aus der Höhe der Lungenwurzel von der Mitte zwischen Pleura und Lungenwurzel systematisch Gewebeproben entnommen und auf 1 mm Kantenlänge würfelförmig weiterpräpariert. Die folgenden Präparationen wurden an den kleinen Lungenwürfeln vorgenommen. Hierauf schloß sich eine Nachfixierung über eine Stunde, eine Dehydratation in der aufsteigenden Alkoholreihe und

eine Einbettung in Araldit an. In der letzten Aralditstufe wurden randomesierte Gewebeproben (insgesamt 10 pro Lunge) eingebettet und polymerisiert. Für die morphometrische Auswertung wurden am Reichert OM 2 und am LKB Ultratom 3 mit Glasmessern 1/ μ dicke Semi-Dünnschnitte angefertigt, die mit Toluidinblau-Azur-2 gefärbt wurden.

Methodik der morphometrischen Auswertung

Ziel der Untersuchungen war es, anhand der Zahl der Alveolarmakrophagen und der Pneumozyten Typ 2 eine quantitative Beschreibung der unter den Versuchsbedingungen auftretenden Veränderungen in der Lunge zu ermitteln. Weiterhin sollte eine Messung der Volumenanteile des Alveolarseptumgewebes und der inneren Lungenoberfläche vorgenommen werden. Zu diesem Zwecke wurde ein Meßsystem nach WEIBEL (14) in das mikroskopische Bild des Alveolarparenchyms projiziert. Das Meßsystem besteht aus regelmäßig angeordneten Linien mit einer Länge Z und Punkten an den Enden der jeweiligen Linie. Die Gesamtlänge der Testlinien ist

$$L_T = 1/2 \times p_T \times Z \quad (1).$$

In dem verwandten Testsystem lagen 21 Linien mit 42 Punkten vor. Es wurde eine mikroskopische Vergrößerung von 50 x $\bar{O}1$ in einem Wild-Mikroskop gewählt. Das verwendete mikroskopische Objektiv besitzt bei einer mittleren Vergrößerung eine sehr hohe Apertur von 1,01 und erlaubt somit, trotz eines relativ großen Übersichtsfeldes, eine präzise Erkennung der vorliegenden histologischen Strukturen. Alveolarmakrophagen lassen sich z.B. in Semi-Dünnschnitten bei der gewählten Optik durch ihre pleomorphen Ausläufer und die relativ unruhige Anordnung der osmeophilen Körper erkennen, wohingegen die Pneumozyten

Typ 2 strikt an der Alveolarwand anliegen und nur am apikalen Pol kleine regelmäßig geformte Ausläufer sowie im Zelleib gleichmäßig verteilte osinophile Körperchen erkennen lassen. Diese, anhand von elektronenmikroskopischen Bildern eruierten Diskriminationskriterien (15) können bei der gewählten Versuchsanordnung mit einer relativ großen Genauigkeit auch im lichtmikroskopischen Bild verwandt werden. Die Kantenlänge des verwendeten Testsystems beträgt $6 \times 6,06 \text{ Z}$, wobei Z in der gewählten Vergrößerung $25/\mu$ lang ist. Die Fläche des Testsystems in der gewählten Versuchsanordnung beträgt $22,7 \cdot 10^3/\mu^2$, das Einheitsvolumen entsprechend $3,428 \cdot 10^6/\mu^3$. Ausgezählt wurden nur die Alveolarmakrophagen und Pneumozyten Typ 2, die mit ihrem Kern im Schnittvolumen lagen. Die Zahl der Alveolarmakrophagen bzw. der Pneumozyten Typ 2 kann dann in einer numerischen Flächendichte angegeben werden. Weiterhin wurden ausgewertet die Oberflächendichte über die Zahl der Schnittpunkte S der Alveolaroberfläche mit den hineinprojizierten Testlinien nach der Formel

$$S = \frac{4 \times S_{\text{Luft}}}{Z \cdot P} \quad (2).$$

Als letzter Wert wurde schließlich die Zahl der Treffer der Endpunkte der Testlinien über dem Alveolarseptumgewebe ermittelt; der Anteil der Treffer über Gewebe an der Gesamtpunktzahl im Testsystem entspricht dem Volumenanteil der Alveolarstrukturen am Lungengewebe. Für die exakte Ermittlung der Anzahl der Zellen im Einheitsvolumen muß die Zahl der numerischen Flächendichte der Zellen im Einheitsgewebe unter Berücksichtigung des Schnittvolumens nach einer Formel von HENNIG (16) weiterverrechnet werden.

$$N_v = n_v \cdot \frac{V}{A \cdot (2r + T)}$$

N_v = tatsächliche Kugelanzahl im Schnitt im Bezugsvolumen V
 n_v = gezählte Kugelanzahl im Schnitt im Bezugsvolumen V
 T_v = Schnittdicke
 A = Fläche des Auswertungsfeldes
 r = Kugelradius

In dieser Formel geht als wesentlicher variabler Parameter der Durchmesser der Zellkerne ein. Wir übernahmen nach elektronenmikroskopischen Auswertungen eine Zellkerndurchmesser von $7,0 \mu$ sowohl für die Alveolarmakrophagen als auch für die Pneumozyten Typ 2; dieser Wert kann vernünftigerweise im Rahmen der Genauigkeit des Meßsystems verwendet werden.

Die Auswertung erfolgte dergestalt, daß das Meßsystem an einem definierten Ende des Schnittes so angelegt wurde, daß die Fläche vollständig von Alveolarparenchym bedeckt war. Das nächste Meßfeld wurde in der X-Achse um 200μ verschoben und ausgewertet soweit Alveolarstrukturen vorlagen; traten in dem Schnitt große Gefäße oder Strukturen des Bronchialgewebes auf, so wurde der Schnitt ausgelassen und das Feld um weitere 200μ verschoben und so fort, bis das Ende des Schnittes erreicht war; es erfolgte dann eine Verschiebung in der Y-Richtung und anschließend in der reziproken X-Richtung, wobei eine Auswertung erst dann wieder vorgenommen wurde, wenn, wie bereits oben gesagt, das Meßfeld vollständig von Alveolarparenchym bedeckt war. In dieser Form wurde der Schnitt systematisch mäanderförmig abgetastet; die Meßergebnisse eines jeden Feldes wurden zur Ermittlung der Einzelvarianzen auf der Ebene der Schnitte separat in vier verschiedenen Kanälen des Digiscan-Phasenintegrators (Fa.KONTRON) jeweils einzeln abgespeichert und nach Beendigung der jeweiligen Messung in den Zentralcomputer PDP 10 auf einem Datenfile abgelegt.

Die in dieser Weise gewonnenen Daten können auf verschiedenen Ebenen hinsichtlich ihrer Varianz und des Mittelwertes miteinander verglichen werden; da keine Erfahrungen bei den hier gewählten Parametern vorlagen, mußte in der ersten Versuchsserie zur endgültigen Festlegung des Auswerteverfahrens eine systematische Analyse der Varianzen auf den verschiedenen Ebenen der Auswertung vorgenommen werden.

1. Ebene - Varianz innerhalb eines Schnittes
2. Ebene - Varianz innerhalb verschiedener Schnitte eines Tieres
3. Ebene - Varianz innerhalb verschiedener Tiere einer Gruppe und
4. Ebene - Varianz innerhalb der versuchsbedingten Gruppen (Kontrolle = Gruppe Ko, Quarz = Gruppe A, Quarz + PVNO = Gruppe B).

Geprüft wurde neben der Varianz die Mittelwertsunterschiede sowie die Verteilung der Stichproben unter dem Gesichtspunkt der Normal- bzw. Lognormalverteilung.

Nach Erarbeitung dieser Grundlagen wurde die zweite Versuchsserie dergestalt vorgenommen, daß von jedem Tier ein Schnitt vollständig ausgewertet wurde, wobei für die Kontrolle 7 Tiere, für die Quarzgruppe 6 Tiere und die Quarz + PVNO-Gruppe 5 Tiere zur Auswertung herangezogen wurden. Tiere, die nur ungenügend fixiert wurden, oder aber Krankheiten der Lunge (Abszeß) aufwiesen, wurden nicht in die Auswertung genommen. Hieraus erklärt sich die unterschiedliche Besetzung der Gruppen. Für den statistischen Vergleich wurde der T-Test und der Parameter-freie U-Test verwandt.

Ergebnisse

Zur besseren Veranschaulichung der in den verschiedenen Versuchsgruppen auftretenden unterschiedlichen histologischen Bilder sind in der Abbildung 1 - 4 elektronenmikroskopische Aufnahmen bei niedriger Vergrößerung einander gegenübergestellt worden. Es zeigt sich, daß die beiden mit Quarz belasteten Gruppen sich deutlich von der Kontrolle im Hinblick auf die Zahl der Pneumozyten Typ 2 und die Alveolarmakrophagen von der Kontrolle unterscheiden. Weiterhin bemerkt man, daß im Alveolarlumen in großen Mengen osmophile Körper und Surfactantstrukturen auftreten, die insbesondere in der Quarz-

(Abb. 1 - 4). Unter qualitativ histologischen Kriterien unterscheidet sich die Gruppe Quarz von der mit PVNO therapierten Quarzgruppe vor allem durch die geringe Zahl der erwähnten intraalveolären Komponenten.

Die quantitativ morphometrische Auswertung wurde mit dem Ziel vorgenommen, diese an sich qualitativ schon zu objektivierenden Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen zahlenmäßig zu definieren und die Sicherheit der Unterschiede von der unbehandelten Kontrolle und untereinander im statistischen Sinne zu ermitteln. Auf den beiden Abbildungen 5 und 6 sind die im ersten Durchgang gewonnenen Ergebnisse in Form von Kolumnen mit eingezeichneter Varianz für jeden Schnitt einzeln aufgezeichnet, wobei die Schnitte eines Tieres jeweils gruppiert wurden; angegeben sind die Zahl der Alveolarmakrophagen und der Pneumozyten Typ 2 (NP 2) für 4 Kontrolltiere zu jeweils 4 Schnitten (1-16) und einem PVNO-Tier (17 - 20) und einem weiteren Quarztier (21-24) mit jeweils 4 Schnitten. Man erkennt, daß im Mittel in einer Einheitsfläche etwa eine Alveolarmakrophage und ca. zwei Pneumozyten zu finden sind. Weiterhin wird aus der Abbildung deutlich, daß die Zahl der Alveolarmakrophagen pro Schnitt jeweils auf ein Tier bezogen, relativ gleichmäßig verteilt ist, wohingegen die Pneumozyten Typ 2 in einem Tier in Abhängigkeit von dem jeweiligen Schnitt sehr unterschiedliche Belegungsdichten zeigen (z.B. 9 gegen 12). Die Zahl der Alveolarmakrophagen liegt für die Quarz + PVNO-Gruppe deutlich höher als die Kontrolle und wiederum um einen Faktor 2 nochmals höher bei der Quarz-Gruppe; dieser Unterschied der Zellzahl gegenüber den Kontrollen bzw. innerhalb der Quarz-Gruppen ist bei den Pneumozyten Typ 2 nicht festzustellen. Hier hat sich die Zahl der Pneumozyten Typ 2 in der mit PVNO behandelten Quarzgruppe der Kontrolle angeglichen, wohingegen die Zahl dieser Zellen in der Quarzgruppe etwa doppelt so hoch liegt. Bei tierweiser Zusammenstellung der auf der Schnittebene gewonnenen Ergebnisse in Form von Mittelwerten je Tier ergeben sich gegenüber der vorherigen Betrachtung

einige Unterschiede. Hier scheinen die Kolumnen anzudeuten, daß innerhalb der Kontrollgruppe zwischen den Tieren jeweils in Abhängigkeit von dem individuellen Tier unterschiedliche Belegungsdichten im Hinblick auf die Alveolarmakrophagen vorliegen (z.B. Tier 1 gegen Tier 2), wohingegen die durchschnittlichen Pneumozyten Typ 2 - Werte zwischen den Tieren innerhalb der Kontrollgruppe annähernd gleich hoch sind. Der Unterschied aller Kontrollen gegenüber dem mit PVNO behandelten Quarz-Tier bzw. dem nur mit Quarz behandelten Tier ist bei beiden Zellarten, wie bereits im Einzelvergleich auf der Schnittebene festgestellt wurde, recht deutlich.

Die Analyse der in den Kolumnen sich andeutungsweise darstellenden speziellen Befunde wurde mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse vorgenommen. Die F-Werte der Varianzanalyse spiegeln das Verhältnis der Varianzen auf der Ebene der Meßfelder und der Schnitte wider (Tab. 1). Es ergibt sich, soweit man nur die Kontrolltiere untereinander betrachtet, beim Vergleich der Ergebnisse eines Tieres über 4 Schnitte hinsichtlich der Alveolarmakrophagen ein F-Wert in der Nähe von 1. Das bedeutet, daß die Unterschiede innerhalb eines Tieres zwischen den Schnitten sehr klein sind und daß weiterhin die Varianz zwischen den Schnitten innerhalb eines Tieres geringfügig größer ist als innerhalb eines Schnittes. In einem Fall beträgt der F-Wert 0,293, was besagt, daß die Stichprobengröße auf der Ebene der Meßfelder in Anbetracht der Varianz innerhalb der Schnitte zu klein war; dies ist jedoch unter allen vorgenommenen Zählungen nur ein einziges Mal hervorgetreten. Wendet man die am Beispiel der Alveolarmakrophagen vorgenommenen Auswertungskriterien auf die Pneumozyten Typ 2 an, so fällt bei Durchmusterung der F-Werte für die P_2 -Zellen sofort auf, daß beim ersten Tier der F-Wert 4,5 und beim dritten mit 6,6 ein hoher Wert erreicht wurde (Tab. 1). Die Einzelauswertung im T-Test ergab über die Zahl der Pneumozyten Typ 2 innerhalb eines Tieres beim Vergleich von einem Schnitt gegenüber dem anderen signifikante Unterschiede. Hieraus kann abgeleitet werden, daß die Pneumozyten Typ 2-Population im

Gegensatz zu der Alveolarmakrophagen-Population in den verschiedenen Lungenarealen eines Tieres ungleichmäßig besetzt ist.

Völlig anders liegen die Verhältnisse, wenn innerhalb der Kontrollgruppen verschiedene Tiere hinsichtlich der Alveolarmakrophagen und der Pneumozyten Typ 2 mit Hilfe der Varianzanalyse des T-Testes verglichen werden. Hier zeigt sich nun, daß die Alveolarmakrophagenzahl pro Tier innerhalb der Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich ist, wohingegen die Pneumozyten Typ 2 bei allen Tieren annähernd gleiche Mittelwerte aufweisen (Tab. 2).

Bei der weiteren statistischen Untersuchung des Vorversuches wurden die einzelnen Schnitte unabhängig von dem Tier, aus dem sie gewonnen wurden, miteinander unter Einschluß der Quarz + PVNO- bzw. Quarztiere verglichen. Hierbei war von Interesse, ob unter Berücksichtigung des im vorherigen Absatz analysierten spezifischen Verhaltens der Alveolarzellen in Abhängigkeit der jeweiligen Varianz auf der Ebene der Schnitte und der Tiere versuchsabhängige Unterschiede meßbar werden. Zu diesem Zwecke wurden die Werte aller Schnitte der Kontrolltiere mit allen Schnitten der beiden Versuchstiere verglichen. Als statistischer Test zum Vergleich wurde neben dem T-Test auch der parameterfreie U-Test herangezogen, da die Stichprobenvarianzen teilweise unterschiedlich waren und somit auch keine Normal- bzw. Lognormalverteilung der Ergebnisse auf der Ebene der Schnitte vorlag. Das Ergebnis der Untersuchung läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die Zahl der Makrophagen in allen Schnitten der 4 Kontrolltiere ist gegen alle entsprechenden Stichproben der beiden Versuchstiere signifikant unterschiedlich; weiterhin zeigen auch ausnahmslos alle Schnitte des mit PVNO behandelten Tieres eine statistisch gesicherte niedrigere Besetzung mit Alveolarmakrophagen als die Schnitte des allein mit Quarz behandelten Tieres.

2. Bei den Pneumozyten Typ 2 ergeben sich diese Unterschiede dergestalt, daß alle Schnitte der Kontrolltiere und des PVNO-Tieres gegen alle Schnitte des Quarztieres hochsignifikant unterschiedlich sind.

Die Stichprobengröße auf der Ebene der Alveolen ist also im Vergleich zu den Mittelwertunterschieden zwischen den Gruppen sicherlich sehr hoch. Diese Aussage bestätigt die Ergebnisse aus der Besprechung der F-Werte beim Vergleich der Stichproben auf der Ebene der Schnitte und auf der Ebene der Tiere.

Auf der Grundlage der in der ersten Versuchsserie erarbeiteten Resultate wurde für die eigentliche Auswertung des Versuches pro Tier nur ein Schnitt herangezogen, wobei 7 Kontrolltieren 6 Quarztiere und 5 PVNO-Tiere gegenüberstanden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in den beiden Abbildungen 7 und 8 graphisch zusammengestellt. Die einzelnen Spalten bedeuten die anhand eines Schnittes pro Tier gewonnenen Werte, die Tiere wurden jeweils gruppenweise zusammengestellt; der mit eingezeichnete Vertrauensbereich basiert auf den Meßfeldern eines Schnittes des jeweiligen Tieres.

Die weitere Auswertung der Daten wurde anhand der F-Werte der Varianzanalyse durchgeführt (Tab. 3). Hier bestätigt sich in den Kontrollgruppen, die schon in der ersten Versuchsserie ermittelte Aussage. Die Schwankungen der Werte von Tier zu Tier bezüglich der Makrophagenzahl sind erheblich und wesentlich höher als bei den Pneumozyten Typ 2. Innerhalb der Versuchsgruppen steigen die F-Werte nochmals deutlich an, zeigen aber auch hier die Zelltyp-abhängige Ausprägung. Hieraus kann entnommen werden, daß die Makrophagenzahl in einem größeren Maße von der individuellen Reaktionslage der Tiere abhängt, während die Typ 2-Zellen ein mehr uniformes Verhalten erkennen lassen. In Abb. 9 und 10 geben die Spalten mit den eingezeichneten Vertrauensbereichen einen Eindruck von den globalen gruppen-

abhängigen Unterschieden der Versuchstiere. Die statistische Vergleichung mit Hilfe des T-Testes (Werte log-transformiert) ergab (Tab. 4), daß nach Inhalation von Quarz die Zahl der Makrophagen auf etwa den 6-fachen Wert der Kontrolltiere, die der Pneumozyten Typ 2 auf etwa den 3-fachen Wert ansteigt. Unter dem therapeutischen Einfluß von PVNO sinkt die Zahl der Makrophagen deutlich ab, ohne jedoch die Norm zu erreichen; die Zahl der Pneumozyten erreicht dagegen praktisch das Niveau der Kontrolltiere.

Diskussion

Die vorgelegten Untersuchungen beschreiben eine dem eigentlichen Silikosegeschehen, der fibrotischen Entwicklung, vorgeschalteten Reaktion: das Verhalten der Zellpopulation auf der Ebene der Alveolen als Antwort auf den inhalierten Quarzstaub. Diese Reaktion ist gekennzeichnet durch eine Vermehrung der Alveolarmakrophagen und der Pneumozyten Typ 2. Es handelt sich hier um eine quarzspezifische Antwort im alveolären Milieu, die, wie bereits frühere Untersuchungen zeigen konnten (13), primär durch die Einwirkung der Quarzstäube auf die Alveolarmakrophagen konditioniert wird. Durch den zytotoxischen Effekt des Quarzstaubes auf die Alveolarmakrophagen erfolgt eine Umstimmung des Stoffwechselverhaltens der Phagozyten, in deren Folge eine Vermehrung der Pneumozyten Typ 2 induziert wird. Diese Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, daß die Pneumozyten Typ 2 keine phagozytischen Eigenschaften besitzen und allenfalls nur fakultativ an der äußeren Zellmembran mit Quarzstaub unmittelbar in Berührung kommen. Als Folge kann allgemein eine Veränderung des Mikromilieus der Alveole beschrieben werden, die zu einer Verminderung der bronchialen Elimination der Phagozyten führt und eine septale bzw. lymphatische Penetration der Quarzstäube begünstigt; dieses Verhalten wurde bereits früher von KLOSTERKÖTTER (6, 7) als Lymphotropismus der Quarzstäube beschrieben. Diese Untersuchungen zeigen auch eine fast voll-

ständige Hemmung des Lymphtropismus der Quarzstäube durch eine prophylaktische Gabe von PVNO. Weiterhin wurde festgestellt, daß sich unter einer prophylaktischen Gabe von 200 mg PVNO/kg Körpergewicht vor der Quarzinhalation die Vermehrung der Alveolarmakrophagen in der Alveole und der Pneumozyten Typ 2 vollständig inhibieren läßt. Die vorliegende Untersuchung befaßt sich mit der Möglichkeit, eine quarzbedingte Veränderung des Mikromilieus der Alveole durch PVNO therapeutisch zu beeinflussen. Hierzu wurden morphometrische Methoden weiterentwickelt, wobei zusätzliche Erkenntnisse zum Verhalten der Zellpopulation des Alveolarparenchyms gewonnen wurden. Weiterhin erfolgte eine Beurteilung der Lungen unter qualitativ licht- und elektronenmikroskopischen Aspekten. Die morphologischen Bilder als auch die morphometrisch quantitativen Befunde belegen eindeutig eine hohe Wirksamkeit von PVNO auch in der therapeutischen Versuchsanordnung. Im Gegensatz zu der prophylaktischen Untersuchung zeigt sich allerdings in diesem Fall ein vorwiegend auf die Pneumozyten Typ 2 gerichteter Vektor der Wirksamkeit, während die Alveolarmakrophagen zwar in der Zahl abgenommen haben, aber immer noch deutlich höher als bei den Kontrolltieren sind. Dies kann unter Umständen durch die Staubeigenschaft des Quarzstaubes erklärt werden, die in jedem Fall eine gewisse Vermehrung der Alveolarmakrophagenzahl induzieren müßte, wohingegen die zusätzliche Eigenschaft der Zytotoxizität eine über dieses Maß der Alveolarmakrophagenvermehrung hinausgehende Anreicherung der Zellen im Alveolarlumen verursachen dürfte. Diese Deutung ordnet sich zwanglos in die vorgelegte Hypothese der Effektivität von Quarz auf die Alveolarmakrophagen ein. So müßte eine Wirksamkeit der polymeren Schutzsubstanz sich vor allen Dingen dahingehend äußern, daß zwar unter dem Reiz "Staub" eine Phagozytenvermehrung auftritt, andererseits aber der Stoffwechsel der Alveolarmakrophagen durch die nachträgliche Gabe von PVNO sich wieder normalisiert hat, so daß die quarzspezifischen sekundären Effekte wie die Verminderung der bronchialen Elimination durch die zytotoxische Immobilisierung der Zellen und durch die Über-

ladung durch Surfactantlipide wieder aufgehoben werden. Die Reduktion der Alveolarmakrophagenzahl läßt erwarten, daß bei längerer Versuchsdurchführung, wenn weiter kein Quarzstaub inhaliert wird, sich auch die Alveolarmakrophagenzahl letztlich den Kontrollen angleichen wird; innerhalb eines Versuchszeitraumes von 2 Monaten war eo ipso kein vollständiges Absinken auf die Kontrollwerte zu erwarten, da auch bei Inertstäuben eine Halbwertszeit von etwa 40 bis 60 Tagen für alveolärdeponierte Stäube eingesetzt wird. Die Reduktion der Pneumozyten Typ 2 steht in guter Übereinstimmung mit biochemischen Befunden, die bei einer bestehenden Silikose unter Therapie mit PVNO eine deutliche Reduktion der pulmonalen Phospholipide ermittelten (9). Seit längerer Zeit ist bekannt, daß die eigentliche Ursache der Phospholipidvermehrung unter Quarzstäuben durch die spezifische Sekretion der Phospholipide über die Pneumozyten Typ 2 bewirkt wird. Die Reduktion der Pneumozyten Typ 2 auf das Niveau der Kontrolltiere steht demzufolge mit den biochemischen Befunden in guter Übereinstimmung.

Die hier beobachtete günstige Effektivität von PVNO auf der Ebene der Alveolen könnte auch für die Behandlung der menschlichen Silikose bedeutsam sein. Im histologisch-pathologischen Bild der akut verlaufenden Silikose der Mineure aus dem Tunnelbergbau steht, neben einer fibrotischen Entwicklung, insbesondere eine überschießende Reaktion im alveolären Bereich im Sinne der hier beschriebenen Veränderungen im Vordergrund (10). Das klinische Bild der pulmonalen Insuffizienz ist in solchen Fällen, wenigstens teilweise, durch die Blockade des Gastransportes an der Alveolarwand durch die im Übermaß vorhandenen Phospholipide mitbedingt. Bei einer Übertragung der hier vorgelegten Befunde auf die menschliche Lunge dürfte damit eine entscheidende Verbesserung der pulmonalen Insuffizienz zu erreichen sein.

Als Nebenergebnis der Untersuchung wurden neue Daten über das alveoläre Mikromilieu von Normaltierlungen erarbeitet. Von Interesse ist die differente Anzahl der Alveolarmakrophagen und der Pneumozyten Typ 2 bei verschiedenen Tieren in unterschiedlichen Regionen der Lunge. Die relativ großen Schwankungen der Phagozyten-Population in nicht belasteten Lungen ist bereits aus Versuchen mit Bestimmungen der Alveolarmakrophagenzahl aus Lungenspülflüssigkeiten bekannt (17); sicherlich spiegelt sich hier ein mehr systemisches Verhalten im Rahmen der immunologischen Abwehrlage des Gesamttieres wider. Nach Staubbelastung finden sich demgegenüber größere regionale Schwankungen, wobei die Menge an Staub in der betreffenden Region als determinierender Faktor eingehen dürfte.

Umgekehrt beobachtet man überraschend große regionale Unterschiede der Pneumozyten Typ 2-Zahl; in bezug auf die Gesamtlunge ergeben sich dabei aber sehr konstante Werte. Offenbar scheint die Funktion der Surfactantlipide als ein das Alveolargerüst stabilisierender Faktor als entscheidende Determinante einzugehen. Die Erfordernisse an diese Funktion der Surfactantlipide sind regional relativ unterschiedlich in Abhängigkeit von anderen das Lungengerüst aufbauenden Strukturen. Diese neuen Befunde bedürfen unbedingt der weiteren Ausarbeitung, da hierüber wahrscheinlich wesentliche Erkenntnisse zur Funktion und Bedeutung des Surfactantlipid-Systems der Lunge zu erwarten sind.

Zusammenfassung

In einer morphometrischen und elektronenmikroskopischen Untersuchung wurde der Einfluß von PVNO auf die durch eine Quarzstaubinhalation erzeugte Alveolitis der Ratte untersucht. Die Ultrastruktur des Alveolarparenchyms unter dem Einfluß von Quarz ist gekennzeichnet durch eine exzessive Anreicherung von Surfactantlipiden. Weiterhin fällt eine Vermehrung der Alveolarmakrophagen und der Pneumozyten Typ 2 auf. Unter einer therapeutischen Applikation von PVNO nach Beendigung der Quarzinhalation tritt nach einem Zeitraum von zwei Monaten ein deutlicher Rückgang der Veränderungen auf.

Die morphometrische Auswertung der Alveolarzellen belegt eine signifikante Steigerung der Zellzahl unter dem SiO_2 Staub:

Alveolarmakrophagen von 16 auf 92×10^6 Zellen/ cm^3 Lunge;
Pneumozyten Typ 2 von 44 auf 117×10^6 Zellen/ cm^3 Lunge.
Unter PVNO sinkt die Zahl der Makrophagen auf einen Wert von 33×10^6 Zellen/ cm^3 , die der Typ 2-Pneumozyten auf 48×10^6 Zellen/ cm^3 Lunge.

Eine weitergehende statistische Analyse deckte neue Befunde zum Verhalten der beiden Zellarten in der Lunge der Kontrolltiere auf. Die Ergebnisse zeigen, daß verschiedene Regionen des Parenchyms unterschiedlich dicht mit den Typ 2-Zellen besetzt sind. Die Gesamtzahl der Zellen pro Tierlunge ist bei allen Kontrolltieren nahezu identisch. Umgekehrt schwankt die Zahl der Alveolarmakrophagen von Tier zu Tier erheblich, wobei aber die Verteilung der Phagozyten im Lungenparenchym relativ gleichförmig ist.

Literatur

1. ALLISON, A.C.: Effects of silica and asbestos on cells in culture.
In: Inhaled Particles III. Proceedings of an International Symposium organized by the British Occupational Hygiene Society in London, 14-23 September, 1970 (W.H.WALTON, Ed.). Vol. I, p. 437-441. Old Woking, Surrey England: Unwin Brothers Limited The Gresham Press 1971.
2. ALLISON, A.C.: Lysosomes and the toxicity of particulate pollutants.
Arch.intern.Med., 128 (1971), 131-139.
3. ALLISON, A.C., HARINGTON, J.C., BIRBECK, M.: An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages.
J.exp.Med., 124 (1966), 141-153.
4. ALLISON, A.C., HARINGTON, J.S., BIRBECK, M., NASH, T.: Observations on the cytotoxic action of silica on macrophages.
In: Inhaled Particles and Vapours II. Proceedings of an International Symposium organized by the British Occupational Hygiene Society. Cambridge, 28 September - 1 October 1965 (C.N. DAVIES, Ed.). p. 121-130. Oxford-London-Edinburgh-New York-Toronto-Sydney-Paris-Braunschweig: Symposium Publications Division Pergamon Press 1967.
5. BECK, E.G.: Die Reaktion in vitro gezüchteter Zellen auf partikelförmige Luftverunreinigungen und hochpolymere Stoffe.
Forschungsberichte des Landes Nordrhein-Westfalen, Nr. 2083. Köln, Opladen: Westdeutscher Verlag 1970.
6. BRUCH, J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die alveolaren und septalen Makrophagen der Rattenlunge.
Silikosebericht Nordrhein-Westfalen, 8 (1971), 101-109.

7. BRUCH, J., SCHLÖSSER, J.W.: Veränderungen der Zellpopulation in den Alveolen der Rattenlunge nach Inhalation von Quarz und ihre Beeinflussung durch PVNO. Silikosebericht Nordrhein-Westfalen, 11 (1977), 175-184.
8. GRÜNSPAN, M., ANTWEILER, H.: Biochemical and biophysical reactions of rat lung tissue to quartz and corundum with and without PVN-oxide treatment. In: Inhaled Particles III. Proceedings of an International Symposium organized by the British Occupational Hygiene Society in London, 14-23 September, 1970 (W.H.WALTON, Ed.), Vol. I, p. 373-377. Old Woking, Surrey, England: Unwin Brothers Limited The Gresham Press 1971.
9. HENNIG, A.: Das Problem der Kernmessung. Eine Zusammenfassung und Erweiterung der mikroskopischen Meßtechnik. Mikroskopie, 12 (1957), 174-202.
10. HEPPLESTON, A.G., STYLES, J.A.: Activity of a macrophage factor in collagen formation by silica. Nature (Lond.), 214 (1967), 521-522.
11. HEPPLESTON, A.G., YOUNG, A.E.: Alveolar lipoproteinous: An ultrastructural comparison of the experimental and human form. J.Path.Bact., 107 (1972), 107-117.
12. KLOSTERKÖTTER, W., EINBRODT, H.J.: Quantitative tierexperimentelle Untersuchungen über den Abtransport von Staub aus den Lungen in die regionalen Lymphknoten. Arch.Hyg.Bakt., 149 (1965), 367-384.

13. KLOSTERKÜTTER, W., EINBRODT, H.J.: Untersuchungen über den Einfluß von Polyvinylpyridin-N-oxid auf die Retention, Penetration und Elimination von Quarz. In: Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub- und Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbau. Bd 5. Detmold 1965. S. 87-89.
14. SCHLIPKÖTER, H.-W., BROCKHAUS, A.: Die Wirkung von Polyvinylpyridin-N-oxyd auf die experimentelle Silikose. Dtsch.med.Wschr., 85 (1960), 920-923; 933-934.
15. SCHLIPKÖTER, H.-W., BROCKHAUS, A.: Die Hemmung der experimentellen Silikose durch subcutane Verabreichung von Polyvinylpyridin-N-oxyd. Klin.Wschr., 39 (1961), 1182-1189.
16. SEEMAYER, N.H.: 1978 persönliche Mitteilung.
17. WEIBEL, E.R., KISTLER, G.S., and W.R. SCHERLE: Practical stereologic methods for morphometric cytology. J.Cell.biol., 30 (1966), 23-29.

	Tier Nr.	AM	P 2
a	Ko 1	0,29	4,50
	2	1,79	1,61
	3	1,48	6,62
	4	1,39	1,15
	Qu+PVNO 5	1,10	0,45
	Quarz 6	20,50	3,01
b	alle Tiere Ko.	8,201	1,964

Tab. 1: F-Werte der Varianzanalyse der 1. Versuchsserie
a) auf der Ebene der Schnitte, b) auf der Ebene der Tiere; AM = Alveolarmakrophagen, P 2 = Pneumozyten Typ 2.

Tier Nr.	$\bar{x}$ ($\times 10^6/\text{cm}^3$)	vs	Tier Nr.	T	Irrt.W. %
1	14,08		2	4,9	0,28 ++
			3	3,4	1,32 ++
			4	2,2	6,76
2	16,29		3	1,3	21,8
			4	2,8	3,4 +
3	24,44		4	1,3	21,6
4	19,58				

Tab. 2: T-Test: Vergleich der Zahl der Alveolarmakrophagen in 1 cm^3 Lunge bei 4 verschiedenen Kontrolltieren.

Gruppe	AM	P 2
Ko	4,44	2,12
A	22,81	14,05
B	9,67	5,82

Tab. 3: F-Werte der Varianzanalyse der 2. Versuchsserie.
 Gruppenweise Errechnung für Alveolarmakrophagen (AM)
 und Pneumozyten Typ 2 (P 2).
 Ko = Kontrolle, A = Gruppe Quarz, B = Gruppe Quarz+PVNO.

Gruppe	$\bar{x} (x10^6/cm^3)$	vs Gruppe	T	Irrt.W.
Alveolarmakrophagen				
Ko	16,44	A	6,38	0,01 +++
		B	2,88	1,59 +
A	92,16	B	3,29	1,00 +
B	33,08			
Pneumozyten Typ 2				
Ko	44,78	A	5,97	0,01 +++
		B	0,52	61,6
A	117,31	B	4,23	0,23 ++
B	48,81			

Tab. 4: T-Test: Vergleich der Zahl der Alveolarmakrophagen
 und der Pneumozyten Typ 2 in 1 cm³ Lunge für die
 Gruppen Kontrolle (ko), Quarz (A) und Quarz+PVNO (B);
 Rechnung mit log-transformierten Werten.

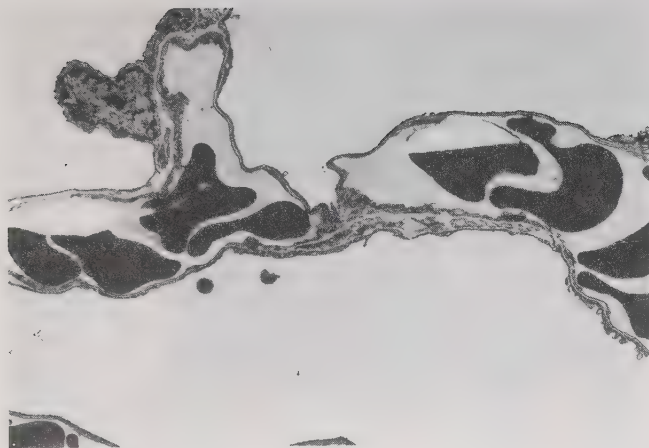


Abb. 1

Lunge eines unbehandelten Kontrolltieres

Vergr. 3200 x

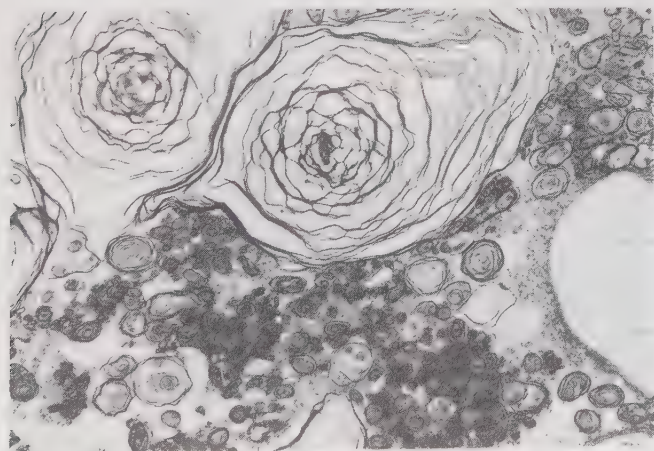


Abb. 2

Anfüllung des Alveolarlumens mit Surfactantstrukturen;

2 Monate nach Inhalation von Quarz; Gruppe A.

Vergr. 3200 x

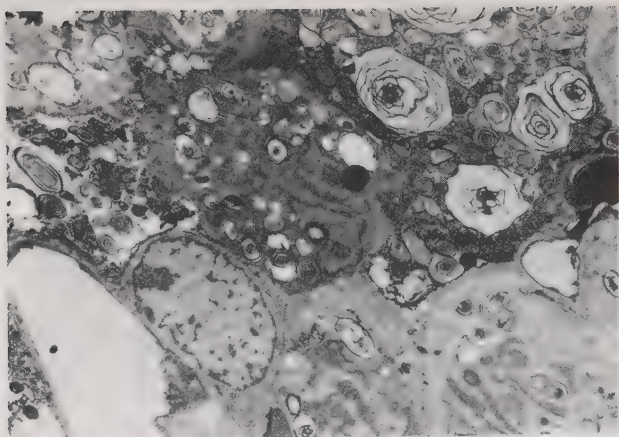


Abb. 3

Obliteration einer Alveole mit Surfactantstrukturen;
mehrere Pneumozyten Typ 2 an der Alveolarwand; 2 Monate
nach Inhalation von Quarz, Gruppe A.

Vergr. 3200 x

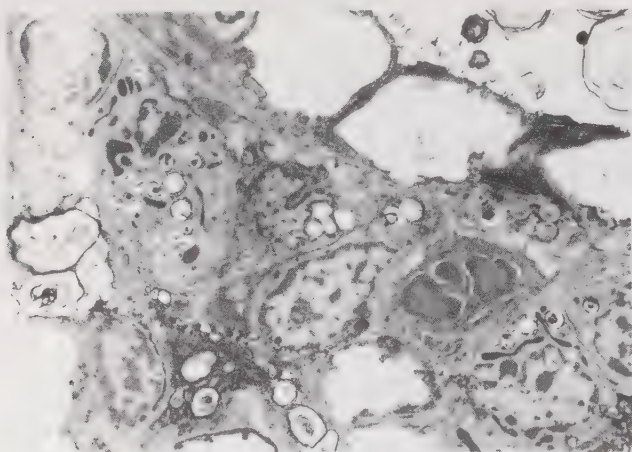


Abb. 4

Intraalveoläres Makrophagengranulom nach 2 Monaten Quarz-
staubinhalation; Gruppe A.

Vergr. 3200 x

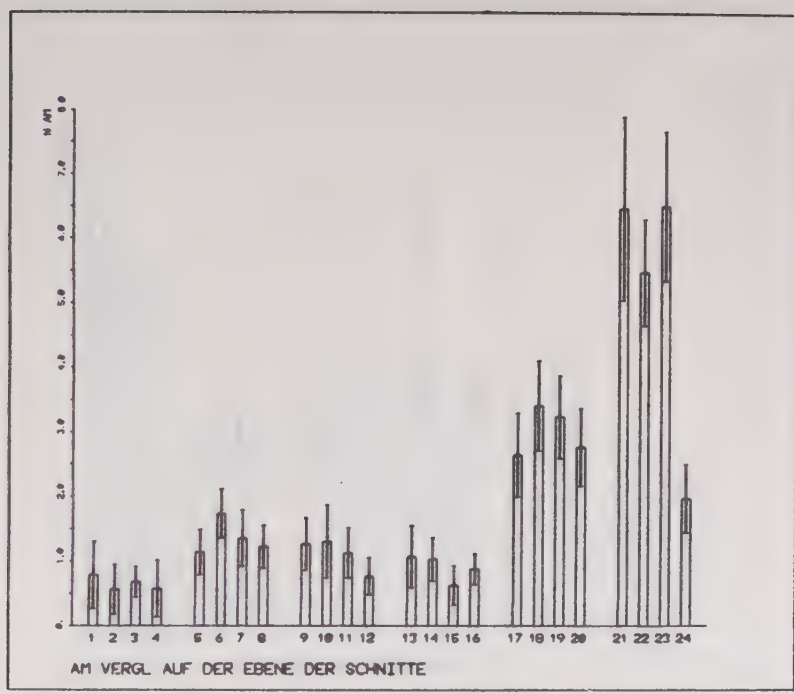


Abb. 5

Zahl der Makrophagen bezogen auf eine Einheitsfläche,
 4 Kontrolltiere mit jeweils 4 Schnitten (1-4, 5-8, 9-12, 13-16),
 1 Tier Quarz + PVNO (17-20) und 1 Tier nur Quarz (21-24); dem
 eingezeichneten Vertrauensbereich liegen die Ergebnisse der
 einzelnen Meßfelder zugrunde.

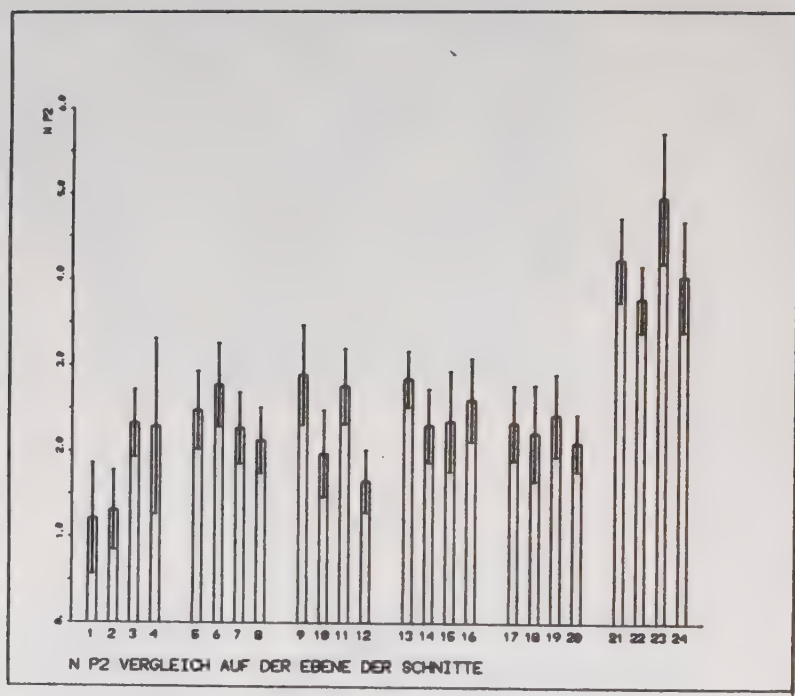


Abb. 6

Zahl der Pneumozyten Typ 2 bezogen auf eine Einheitsfläche;
 Legende wie in Abb. 5.

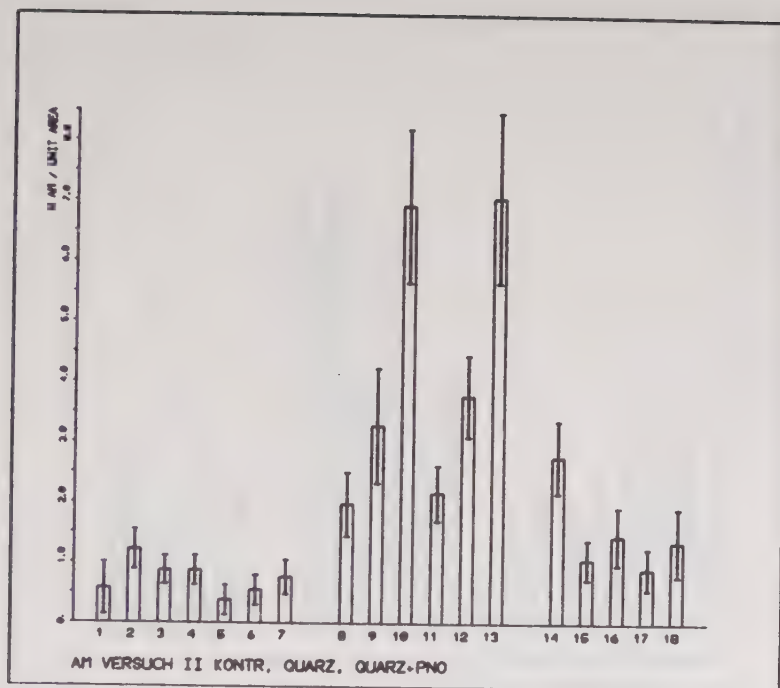


Abb. 7

Zahl der Makrophagen bezogen auf eine Einheitsschnittfläche;
 2. Versuchsserie; 7 Kontrolltiere (1-7), 6 Quarztiere (Gruppe
 A, 8-13) und 5 Quarz + PVNO-Tiere (Gruppe B, 14-18).
 Ein Schnitt pro Tier; dem Vertrauensbereich liegen die Er-
 gebnisse der einzelnen Meßfelder zugrunde.

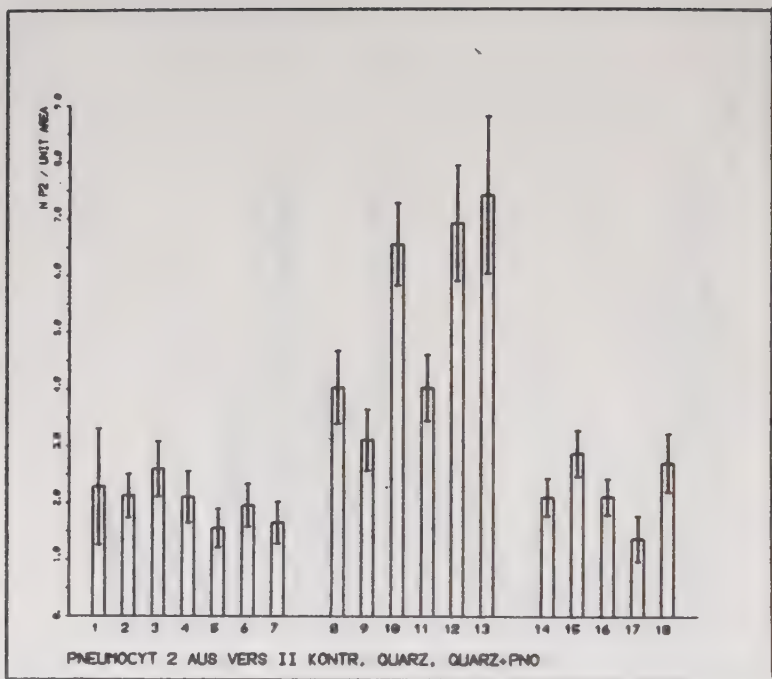


Abb. 8

Zahl der Pneumozyten Typ 2 bezogen auf eine Einheitsschnittfläche; 2. Versuchsserie. Legende wie in Abb. 7.

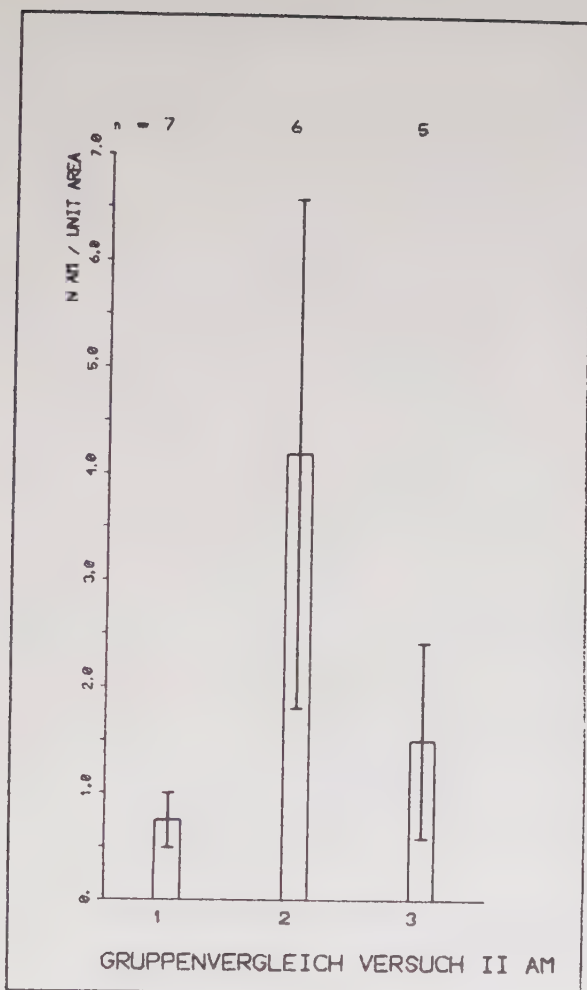


Abb. 9

Gruppenvergleich, 2. Versuchsserie, Alveolarmakrophagen.

Kolumne 1 = Gruppe Ko, 2 = Gruppe A, 3 = Gruppe B.

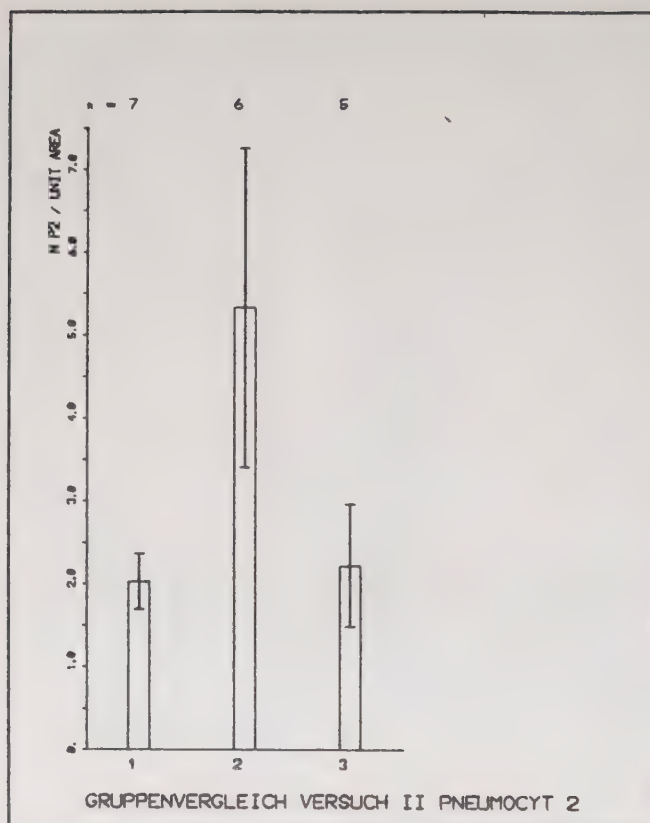


Abb. 10

Gruppenvergleich, 2. Versuchsserie, Pneumozyten Typ 2.

Legende wie in Abb. 9.

Lebenslauf

Geboren: 4.6.1944 in Mistelbach Österreich

Vater: Dr.med.dent.Hermann Wibbing

Mutter: Anne Wibbing geb.Kalbitzer

Schule: Volksschule 1950 - 1955

Gymnasium 1955 - 1962

Lehre 1962 - 1965 als Bauzeichner

Ruhr Kolleg 1965 - 1967

Abitur 1967

Studium: Universität Düsseldorf 1967 - 1972

Studium der Zahnheilkunde

Staatsexamen Oktober 1972

1974

Nach zweijähriger Assistentenzeit

Gründung einer zahnärztlichen

Praxis in Köln-Worringen.

